

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular basis for carbohydrate recognition by mouse macrophage galactose-type C-type lectin (mMGL) 1 and 2  
(マウスマクロファージガラクトース型C型レクチン1及び2による糖認識の分子基盤)

氏名 Oo-puthinan Sarawut

### [背景と目的]

mMGLはユニークなカルシウム依存型レクチンである。II型の膜貫通型糖蛋白質でありカルボキシル末端側に一つの糖鎖認識ドメイン(CRD)を持つ。今日までに明かになったこの分子の機能としては、ガラクトース及びN-アセチルガラクトサミンを末端に持つ糖鎖を含む抗原の取込みと提示、遅延型過敏症の感作時に重要なMGLを発現しているマクロファージの細胞交通の制御、癌細胞の免疫学的な監視などがある。マウスのMGLは互いに相同性の高いMGL1とMGL2の2つの遺伝子を持ち、以前に行なわれたこれらの細胞外ドメイン(ECD)の蛋白質に対する糖鎖の結合性の比較研究から、これらのレクチンは糖鎖認識特異性が異なることが明らかとなった。すなわち、mMGL1はLewis-X構造(Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc)の糖鎖を結合したビオチン化可溶性ポリアクリルアミド(Le<sup>x</sup>-bio-PAA)に高い親和性があるのに対して、mMGL2は $\beta$ -GalNAcまたは $\alpha$ -GalNAc-bio-PAAに親和性が高かった。従って、mMGL1とmMGL2の発現の違いが細胞機能に大きな影響を与える可能性がある。また、mMGL1がフコースを含むLe<sup>x</sup>に高い親和性を有することはガラクトース型C型レクチンとしては通常ありえないことである。リコンビナント型のmMGL1及び2のECDは明らかに異なる糖鎖に認識特異性を示したが、CHO細胞に発現させた全長のmMGL1と2はLe<sup>x</sup>-bio-PAAと $\beta$ -GalNAcまたは $\alpha$ -GalNAc-bio-PAAに同等の親和性を示した。一つの仮説はmMGL1と2がオリゴマー構造を形成しそれによって特異性が変わったと考えることである。

MGL1と2の糖鎖認識特異性の違いの構造的な基盤を明らかにすることは、それらの機能的な重要性を知るために必須であり、またガラクトース型のC型レクチンがLe<sup>x</sup>に対する特異性を持つに至る進化の過程を知るための情報を提供すると考えた。本論文ではMGL1及び2の糖鎖認識特異性を解析することを目的に特定のアミノ酸に変異を導入する分子生物学的なアプローチとNMRを用いたアプローチを行った。さらに、MGL1及び2がオリゴマーを形成するように改変し、糖鎖に対する特異性がどのような影響を受けるかを解析した。

### [方法と結果]

#### 1. mMGL1によるLe<sup>x</sup>認識及びmMGL2によるGalNAc認識の分子機構

##### A. 部位特定変異導入後のmMGL1とmMGL2による結合実験

mMGL1とmMGL2のCRDの部位特定変異導入は、相互変換という形で行い(図1)、糖認識特異性の違いを決めているアミノ酸の同定を目指した。リコンビナントmMGL1、mMGL2、及びそれらの改変体は、可溶性のCRDとして大腸菌にて調整し、ガラクトースセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製した。これらのCRD蛋白質の固相化したLe<sup>x</sup>-Bio-PPAと $\beta$ -GalNAc-Bio-PPAへの結合を表面プラスモン共鳴(SPR)システムによって測定した。mMGL1CRDの61、89、111、125番目の位置のバリン、アラニン、スレオニン、及びフェニルアラニンを、MGL2の対応する位置にあるアミノ酸に置換するとLe<sup>x</sup>-Bio-PPAの結合性が低下した(図2A)。従って、

これらのアミノ酸残基が MGL1CRD の Le<sup>x</sup> に対する特異性を決定していることが明らかとなった。同様に、図 2B に示すように、mMGL2CRD への変異導入から、61、89、125 番目の位置の

<b>mMGL1</b>	1:SEVACCP <del>L</del> H <del>W</del> TEHEGSCYWFSESEKSWPEADKYCRLENSHLVVVNSLEEQNFLQNRLANV <del>V</del> SWIGLTDQNGPWRVVDGTD	80
<b>mMGL2</b>	1:SEVACCP <del>L</del> H <del>W</del> TEHEGSCYWFSESEKSWPEADKYCRLENSHLVVVNSLEEQNFLQNRLANVLSWMLTDQNGPWRVVDGTD	80
<b>mMGL1</b>	81:FEKGFKNW <b>A</b> PLQPDN <b>W</b> FGHGLGGGEDCAH <b>I</b> TTGGPWDDVCQ <b>R</b> TFRWICEMKLAKES-----	137
<b>mMGL2</b>	81:FDKGFKNW <b>R</b> PLQPDN <b>W</b> HGHMLGGGEDCAH <b>F</b> SYDGRWDDVCOR <b>H</b> YHWICETELGKASSAHSPOLIASVP	149

図 1 : mMGL1 及び 2 の CRD の配列。太字は変異を導入した部位。斜字はガラクトースとの結合に関与することが知られている配列。下線はグリシンに富むループ。

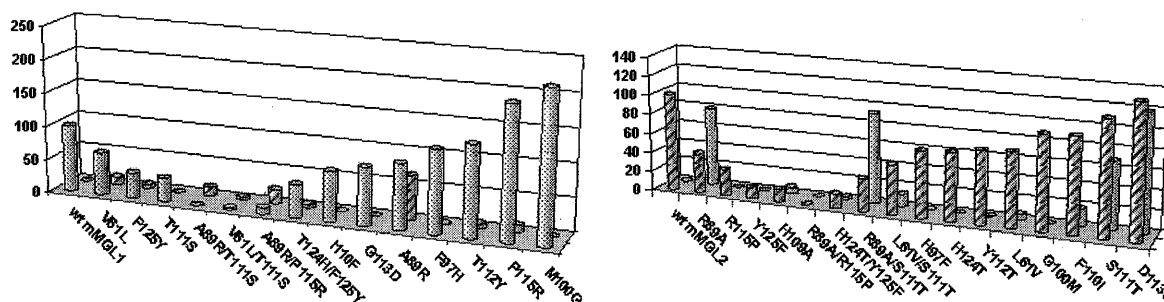


図 2 : mMGL1 の CRD 及びその変異体 (左のパネル)、mMGL2 の CRD 及びその変異体 (右のパネル) の固相化した Le<sup>x</sup>-bio-PAA (点つきカラム) または  $\beta$ -GalNAc-bio-PAA (斜線付きカラム) への結合性。それぞれ野生型 mMGL1 の Le<sup>x</sup>-bio-PAA 及び野生型 mMGL2 の  $\beta$ -GalNAc-bio-PAA への結合の最大値を 100 としてこれに対するパーセントで表示する。

ロイシン、アルギニン及びチロシンが  $\beta$ -GalNAc との優先的な結合に重要であることが明らかとなった。一方、mMGL2 の限られたアミノ酸残基を置き換えるだけ、すなわち R89A、S111T、及び R89A/S111T、で Le<sup>x</sup> に対する結合性を再構築でき、70%以上の結合性の上昇がみられた。mMGL1 から、 $\beta$ -GalNAc への結合性が再構築できた変異体は A89R のみであった。従って、mMGL1CRD におけるアラニン 89 とスレオニン 111 及び、mMGL2CRD におけるアルギニン 89 は、それぞれの糖鎖認識特異性に極めて重要であることが確認できた。

フロントアルフィニティークロマトグラフィー (FAC) によりオリゴ糖に対する mMGL1 と mMGL2 の結合特異性の解析を行った。ここでは、mMGL1、2、及びそれらの改変体を固相化しこれらのカラムからの蛍光標識オリゴ糖の溶出時間の遅れから相対的な親和性を決定した。FAC による解析結果は、SPR による結果と良く一致した。49種類のオリゴ糖及び単糖を比較した結果、変異を導入したレクチンが Le<sup>x</sup>、GalNAc、又は Gal に関係ない糖鎖に対する結合性を持つことはないことが判明した。

MGL2CRD と GalNAc の相互作用を分子モデリングによって予測した。ロイシン 61、アルギニン 89、ヒスチジン 109 の GalNAc との直接の相互作用、及びチロシン 125 の間接的な関与が示された。従って、枠組みとして用いたラット肝アジアロ糖蛋白レセプター-1 による GalNAc の認識に比べ、さらに最適化された相互作用があると考えられた。

## B. mMGL1CRD の Le<sup>x</sup> に対する結合部位の NMR による同定

mMGL1 は単糖としてはガラクトースに親和性を持つゆえ、このレクチンは Le<sup>x</sup> のガラクトース残基に対して親和性を持つと推測された。そこで、ガラクトースモノマーに対する結合部位も同定することとし、mMGL1 と Le<sup>x</sup> との相互作用に関して NMR を用いて、交差飽和法及び化学シフト摂動法によって原子レベルで結合部位を同定した。mMGL1 の主鎖由来シグナルの帰属は、一連の 3 重共鳴実験により行った。Le<sup>x</sup> 結合状態、およびメチル  $\beta$  ガラクトース結合状態における

mMGL1 に対する交差飽和実験において、糖由来プロトンに対するラジオ波照射に伴う、mMGL1 の主鎖アミド基に由来するシグナルの強度減少が観測された。Le<sup>x</sup> の CH/CH<sub>2</sub> プロトン、および Le<sup>x</sup> の Fuc-CH<sub>3</sub> プロトンに対する交差飽和実験の結果をそれぞれ図 3A、3B に示す。化学シフト擾動実験においては、Le<sup>x</sup> 結合に伴う <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N 由来シグナルの化学シフト変化を解析した。顕著な化学シフト変化が観測された残基を図 3C に示す。

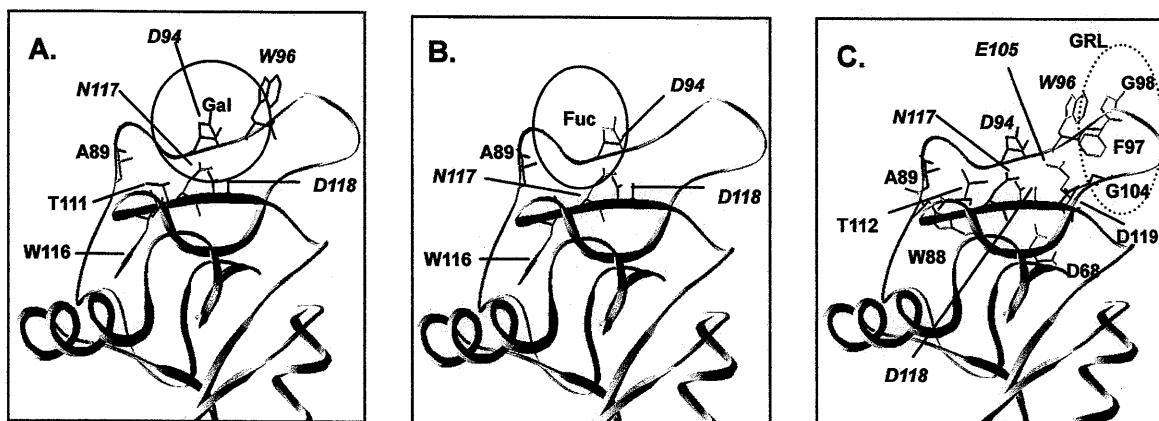


図3：NMRにより交差飽和法 (AとB) 化学シフト擾動法 (C) を用いて明らかにされた Le<sup>x</sup> との結合に関与するアミノ酸を mMGL1 のモデル上に図示した。Aでは Le<sup>x</sup> の CH/CH<sub>2</sub> を飽和させ、Bでは Le<sup>x</sup> の Fuc-CH<sub>3</sub> を飽和させた。斜字は、ガラクトースとの結合に関与するアミノ酸残基。

これらの NMR 実験の結果 mMGL1 による Le<sup>x</sup> 認識の特徴は以下のように提案できる。Le<sup>x</sup> のガラクトース残基は、ガラクトースモノマーとの結合に関与するのと同じアミノ酸を通して、MGL1CRD により認識される。mMGL1CRD のグルタミン 92、アスパラギン酸 94、トリプトファン 96、アスパラギン 117、及びアスパラギン酸 118 の 5 つの残基がそれらである。フコース残基はガラクトース結合部位に近接するアミノ酸であるアラニン 89、アスパラギン酸 94、スレオニン 111、トリプトファン 116、アスパラギン 117、及びアスパラギン酸 118 により構成される領域と相互作用を形成する。このような mMGL1CRD による Le<sup>x</sup> の認識は他の単糖としてはマンノース又はフコースを認識する C 型レクチンがガラクトースではなくフコースとレクチンのカルシウム結合部位の相互作用を通して Le<sup>x</sup> を認識するのとは異なって極めてユニークである。NMR を用いた実験の結果は部位特定変異の結果と良く一致し、mMGL1CRD のアラニン 89 とスレオニン 111 が Le<sup>x</sup> との特異的な相互作用に関与することが確認された。さらに、mMGL1 と Le<sup>x</sup> との相互作用はグリシンに富むループ (図中の GRL) に構造変化を誘発している。これはこのループのフェニルアラニン 97、グリシン 98、グリシン 104 に Le<sup>x</sup> 結合前後で化学シフト変化が観察されたが交差飽和実験では影響が観察されなかったことによって明らかである。

## 2. mMGL1 及び 2 のホモ/ヘテロオリゴマー形成と Le<sup>x</sup> 及び β-GalNAc との相互作用

mMGL1 及び 2 がホモまたはヘテロオリゴマーを形成する可能性について検証した。mMGL1 又は 2 の cDNA を CHO 細胞にトランスフェクトし、蛋白質を化学的に架橋してから免疫沈降した。電気泳動の結果からホモダイマー及びホモテトラマーの存在が明らかとなった。ジスルフィドで共有結合しているオリゴマーを作製するために、mMGL1 と 2 の ECD のアミノ末端に 4 アミノ酸 CECK を遺伝子レベルで連結した。これらの遺伝子を大腸菌に発現させ、mMGL1 と 2 単独または共存下でリフォールドさせた。この方法で人工的に SS 結合を作らせたレクチンについて SDS-PAGE にて解析した。図 4 に示すように、テトラマーが最も多いことが分かった。同じ方法で作製された mMGL1 と 2 のヘテロオリゴマーとして、ダイマー、トリマー、テトラマーが検出された。SPR 法で Le<sup>x</sup>-bio-PAA 及び β-GalNAc-bio-PAA との親和性を測定したところ、CECK 配列を付加した mMGL1 及び 2 の ECD は

いずれも  $Le^x$  と  $\beta$ -GalNAc の両方に対する親和性が増大したことが判明した (図 5)。非共有結合によるオリゴマーや CRD のリコンビナント体ではこのような大きな増大は見られなかった。mMGL1 と 2 の糖鎖認識特異性が CECK の付加によるオリゴマー形成によって変化し、 $Le^x$  と  $\beta$ -GalNAc を見分ける能力を失ったと考えられる。

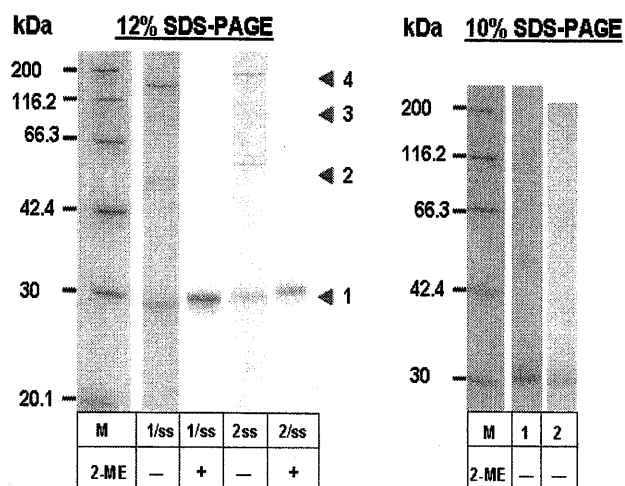


図 4 : リコンビナント mMGL1 及び 2 の ECD の共有結合によるホモオリゴマー形成。リコンビナント蛋白質は *in vitro* でリフォールドさせた後 galactose-sepharose で精製した。これを SDS-PAGE で分画した結果を示す。1/s、2/ss、はそれぞれ mMGL1 と 2 ECD のアミノ末端に CECK を付加させたもの。1、2、は CECK を付加してない mMGL1 及び 2。M、マーカー。2-ME、2-メルカプトエタノール。1、2、3、4、はそれぞれモノマー、ダイマー、トリマー、テトラマーを示す。

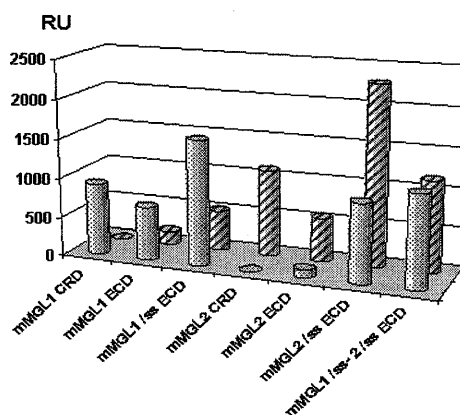


図 5 : mMGL1 及び 2 の CRD (10  $\mu$ M) 及び ECD (2  $\mu$ M) 型の固相化した  $Le^x$ - 又は  $\beta$ -GalNAc-bio-PAA への結合を表面プラズモン共鳴で測定し、最大値によって相対結合強度を比較。ss、アミノ末端に CECK を付加させたもの。RU、共鳴ユニット。

### [結語]

mMGL1CRD による  $Le^x$  の結合と mMGL2CRD の GalNAc への強い結合における構造的な基盤を明らかにした。すなわち、リコンビナント CRD を用いて、アミノ酸残基 61、89、111、及び 125 が糖鎖認識特異性を決定していることを証明した。

mMGL1 と 2 がホモ及びヘテロオリゴマーを形成し、テトラマーが量的に最も多いことを明らかにした。mMGL1 と 2 はオリゴマーを形成すると糖鎖認識特異性が変化することを明らかにした。